

ХИМИЯ
CHEMISTRY

УДК 577.152.31

Поступило в редакцию 01.03.2017

Received 01.03.2017

Н. М. Литвинко, Л. А. Скоростецкая, Д. О. Герловский*Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь***ФОСФОЛИПАЗА A_2 IB – НОВЫЙ ИНДИКАТОР ОЦЕНКИ
ПРО-АНТИОКСИДАНТНОГО СТАТУСА ОРГАНИЗМА***(Представлено членом-корреспондентом И. А. Михайлопуло)*

Аннотация. Изучена эффективность свободнорадикального окисления в фосфолипидных мембранах под воздействием УФ-облучения ($\lambda = 180\text{--}400$ нм) с помощью фосфолипазы A_2 (ФЛА $_2$ IB) как маркера перекисного окисления липидов. Смешанные мицеллы фосфатидилхолина и дезоксихолата натрия были использованы в качестве модели фосфолипидных мембран. Активность ФЛА $_2$ определяли по спектральным изменениям гемоглобина при взаимодействии с жирными кислотами как продуктами фосфолиполиза. Уровень перекисного окисления липидов в то же время оценивали по накоплению малонового диальдегида как хорошо известного продукта облучения фосфолипидов. Получена прямо пропорциональная зависимость активности ФЛА $_2$ от времени УФ-облучения фосфолипидов. Это показывает, что уровень активности ФЛА $_2$ хорошо коррелирует с уровнем перекисного окисления липидов и может охарактеризовать антиоксидантный потенциал крови при использовании известного антиоксиданта Тролокса в качестве стандарта.

Ключевые слова: фосфолиполиз, фосфолипаза A_2 , жирные кислоты, гемоглобин, общая антиоксидантная активность, антиоксидантный потенциал

Для цитирования: Литвинко, Н. М. Фосфолипаза A_2 IB – новый индикатор оценки про-антиоксидантного статуса организма / Н. М. Литвинко, Л. А. Скоростецкая, Д. О. Герловский // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2017. – Т. 61, № 4. – С. 60–68.

Natalia M. Litvinko, Lydia A. Skorostetskaya, Denis O. Gerlovsky*Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus***PHOSPHOLIPASE A_2 IB – A NEW INDICATOR FOR ESTIMATION OF THE PRO-ANTIOXIDANT STATUS
OF THE ORGANISM***(Communicated by Corresponding Member Igor A. Mikhailopulo)*

Abstract. The efficiency of free radical oxidation of phospholipid membranes under exposure to UV radiation ($\lambda = 180\text{--}400$ nm) by the phospholipase A_2 PLA $_2$ IB as a marker of lipid peroxidation was studied. Mixed micelles of phosphatidylcholine and sodium deoxycholate were employed as the model of phospholipid membranes. The PLA $_2$ activity was determined by spectral changes in hemoglobin upon the interaction with fatty acids, resulting from a phospholipolysis product. At the same time, the level of lipid peroxidation was estimated by accumulation of malondialdehyde as a well-known product of irradiation of phospholipids. The directly proportional dependence of the PLA $_2$ activity on the UV irradiation time of phospholipids is obtained. It is shown that the level of the PLA $_2$ activity correlates well with the lipid peroxidation level, pointing to the antioxidant capacity of blood in comparison with the well-known antioxidant Trolox as standard.

Keywords: phospholipolysis, phospholipase A_2 , fatty acid, hemoglobin, total antioxidant activity, antioxidant capacity

For citation: Litvinko N. M., Skorostetskaya L. A., Gerlovsky D. O. Phospholipase A_2 IB – a new indicator for estimations of the pro-antioxidant status of the organism. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2017, vol. 61, no. 4, pp. 60–68 (in Russian).

Введение. В процессе биологического окисления в живых организмах постоянно образуются различные активные формы кислорода (АФК) [1]. Радикальные АФК способны эффективно окислять (и тем самым инактивировать) различные белки и липиды (ПОЛ), разрушать некоторые

полисахариды и стимулировать мутагенез (за счет накопления окислительных повреждений в ДНК) [2], что в совокупности служит проявлением окислительного стресса.

Нарушение баланса между реакциями свободно-радикального окисления (СРО), среди которых основная доля приходится на ПОЛ, и действием антиоксидантных систем организма способствует развитию таких патологий, как атеросклероз, инфаркт миокарда, рак, нейродегенеративные процессы и др. В качестве примеров патологических состояний, развитие которых тесно связано со СРО, можно привести ревматические заболевания [3], атеросклероз [4], осложнения сахарного диабета (кардиомиопатия [5], нефропатия [6], ретинопатия [7]), амиотрофический боковой склероз [8], катаракту [9].

Защитная система клеточных структур от повреждающего действия АФК, продуцирующихся внутри клетки (эндогенные АФК) и действующих извне (экзогенные АФК), известна как ее общая антиоксидантная способность (ОАС) – интегральный показатель антиоксидантного статуса организма, который может оцениваться с помощью общей антиоксидантной активности (ОАА) отдельных его компонентов (антиоксидантов).

Компоненты антиоксидантной системы (антиоксиданты) условно делятся на несколько групп соединений, которые:

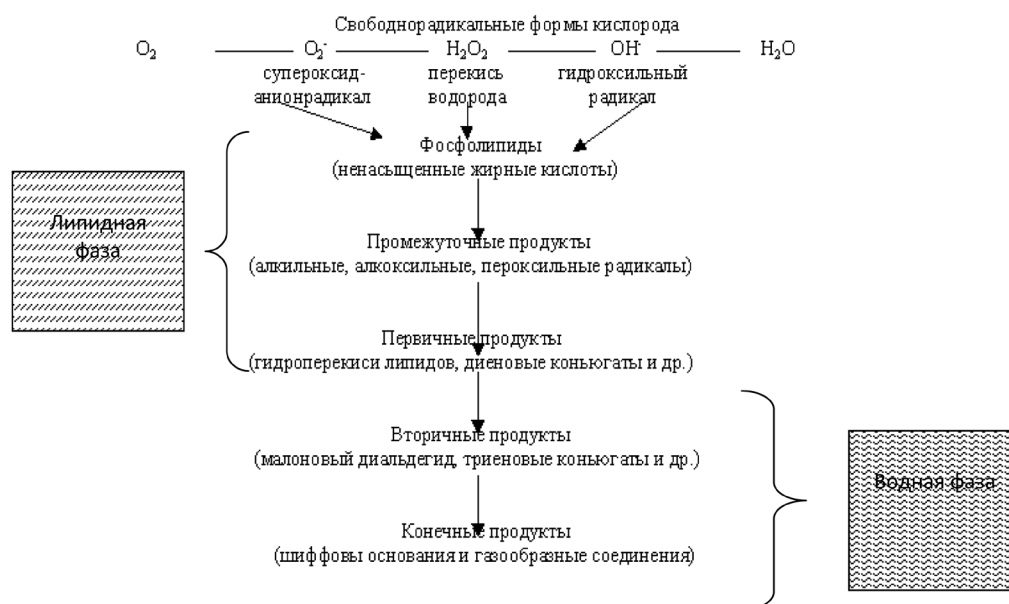
предотвращают образование новых свободных радикалов кислорода (*супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, церулоплазмин, трансферрин, ферритин*);

удаляют свободные радикалы прежде, чем они могут инициировать цепные реакции, повреждающие клетки (*α -токоферол, аскорбиновая кислота, бета-каротин, мочевая кислота, билирубин, альбумин*);

удаляют окисленные липиды или восстанавливают клеточные структуры, поврежденные свободными радикалами кислорода (*фосфолипаза, ферменты восстановления ДНК, метионин-сульфоксидредуктаза*).

До сих пор для оценки антиоксидантной активности биологического материала использовались компоненты, входящие в первые две группы. Фосфолипаза A_2 (К.Ф. 3.1.1.4, ФЛА $_2$) для этих целей не исследовалась.

Система антиоксидантной защиты функционирует по разным механизмам. В случае экзогенных АФК, неспособных проникать глубоко сквозь мембраны, их действие всегда реализуется опосредованно через стимуляцию СРО в липидной фазе клеточных мембран и характеризуется степенью окисления непредельных жирных кислот в составе фосфолипидов:



В связи с этим защита организма от повреждения экзогенными АФК направлена в первую очередь на утилизацию жирнокислотных и липидных гидропероксидов, как продуктов ПОЛ, стимулирующих процессы СРО по принципу цепной реакции. Все соединения, снижающие концентрацию перечисленных веществ в липидной фазе, выполняют функцию антиоксидантов.

К ним относятся ферменты фосфолипаза A_2 и глутатионпероксидаза, которые разрушают гидроперекиси липидов, предотвращая разветвление цепей окисления липидов в мембранах. При этом действие ФЛА $_2$ заключается в отщеплении от фосфолипидов окисленной жирной кислоты, содержащей гидроперекисную группу (LOOH), а действие глутатионпероксидазы сводится к восстановлению этой группы до спиртовой с одновременным окислением глутатиона (GSH) до дисульфида (GSSG).

Цель работы – исследование активности ФЛА $_2$ (тип *IB*) в качестве индикатора для оценки про-антиоксидантного статуса организма и его способности к противодействию факторам инициации окислительного стресса при воздействии УФ-облучения на липидную фазу в модельных условиях.

Выбор ФЛА $_2$ обусловлен тем, что для этого фермента фосфолипиды с перекисно-окисленными жирнокислотными остатками являются более предпочтительным субстратом, чем нормальные фосфолипиды [10]. Поэтому изменение активности этого фермента по отношению к субстрату с перекисно-окисленными жирнокислотными остатками будет свидетельствовать об интенсивности процессов ПОЛ, а также позволит оценить антиоксидантное действие вносимого в систему испытуемого образца биологического материала (например, сыворотки крови).

Материалы и методы исследования. В работе использовали панкреатическую ФЛА $_2$ (Sigma, Р6534) и в качестве субстрата – фосфатидилхолин (ФХ) в мицеллярной фазе, сформированной детергентом дезоксихолатом натрия (ДОХ). Трис, ЭДТА (Serva, Германия), остальные реактивы были отечественного производства. Все органические растворители перед использованием очищались перегонкой.

Хроматографически гомогенный фосфатидилхолин (ФХ) выделяли из желтков куриных яиц [11] и хранили в хлороформе при $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ в запаянных ампулах в атмосфере азота.

Для получения мицелл из аликвоты ФХ упаривали хлороформ при помощи водоструйного насоса при комнатной температуре, после образования пленки дополнительно подсушивали еще 15–30 мин. Далее ФХ солюбилизировали детергентом – 72 мМ дезоксихолатом натрия (ДОХ) в соотношении ФХ/ДОХ = 1/3 до полной прозрачности, разводили 0,05 М трис-НСl-буферным раствором, рН 8,0 до получения конечной концентрации субстрата 0,6 мМ. Параллельно готовили такой же концентрации дезоксихолат натрия для сравнения.

Облучение субстрата осуществляли с помощью облучателя медицинского назначения ОКУФ 5М, имеющего в качестве источника УФ прямую ртутно-кварцевую лампу ПРК-4 мощностью 250 Вт, диапазон излучения 180–400 нм. Под источник УФ на расстоянии 4 см от края облучателя помещали во флаконах мицеллы ФХ–ДОХ, мицеллы ДОХ, а также мицеллы, содержащие в качестве эталона сравнения Тролокс разных концентраций.

Определение активности ФЛА $_2$ проводили гемопротеидным методом [12] на спектрофотометре Specord uv-vis (Германия), используя дифференциальную спектроскопию метгемоглобина (Нб) при его переходе в гемихром под действием жирной кислоты, отщепленной ФЛА $_2$. Дифференциальные спектры Нб характеризовали в единицах оптической плотности как разность поглощения (ΔD) в диапазоне длин волн 405–423 в опытной кювете по сравнению с контрольной.

Реакционная смесь, содержащая 0,05М трис-НСl-буферный раствор, рН 8,0; 1 мМ CaCl_2 , от 0,3 до 0,8 мкг ФЛА $_2$, 5 мкМ гемоглобин (Нб), разливалась в две односантиметровые кюветы и прописывалась нулевая линия. По истечении выбранного периода времени по 100 мкл облученных УФ мицелл ФХ–ДОХ и ДОХ добавлялось одновременно в опытную и контрольную кюветы соответственно и сразу же регистрировались дифференциальные спектры в термостатируемых при $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ячейках в режиме пропускания Т75–125 %. Начальная скорость реакции рассчитывалась по тангенсу угла кинетической кривой. Активность ФЛА $_2$ выражали как тангенс угла наклона кинетической кривой зависимости ΔD (прямо пропорциональной приросту продукта реакции) от времени Δt . Контролем служила величина тангенса угла кинетической кривой фосфолипазной реакции с использованием мицелл субстрата и ДОХ в отсутствии облучения.

Количественную характеристику ОАА крови человека с помощью ФЛА $_2$ проводили по калибровочным кривым, построенным с использованием стандартного антиоксиданта Тролокса. Для этого использовали 1 мМ раствор Тролокса, приготовленный в тот же день. Исходный раствор готовили по навеске с учетом коэффициента молярной экстинкции стандартного антиоксиданта Тролокса в этаноле $E^M = 3260$, $\lambda = 292\text{ нм}$ [13].

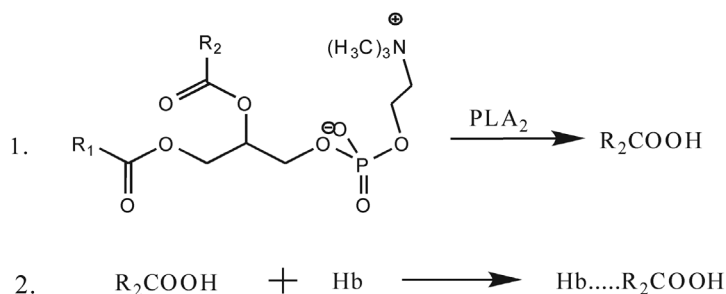
Получение сыворотки крови. Свежесобранную венозную кровь переливали в стеклянную пробирку и оставляли на 30 мин при 20 °С до образования тромба. Затем тонкой стеклянной палочкой аккуратно проводили по стенкам пробирки для отделения тромба. Центрифугировали 15 мин при 1500 об/мин. После отделения форменных элементов крови и сгустка сыворотку разливали по аликвотам и хранили при –18 °С.

Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) контролировали по количеству образующегося малонового диальдегида (МДА) с помощью тиобарбитуровой кислоты. Для этого к 0,3 мл мицелл ФХ-ДОХ (1/3, моль/моль) добавляли 1,5 мл 20 %-ного раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ), 1 мл 0,9 %-ной тиобарбитуровой кислоты (ТБК) и 0,6 мл дистиллированной воды. Полученную смесь помещали в кипящую водяную баню на 60 мин. После охлаждения пробы центрифугировали 5 мин при 1500 об/мин. Затем измеряли оптическую плотность надосадочной жидкости на спектрофотометре Solar ($\lambda = 532$ нм). В качестве контроля использовали дистиллированную воду. Концентрация МДА вычислялась в ходе построения калибровочной кривой, исходя из известных концентраций МДА.

Результаты и их обсуждение. Как известно, при поглощении квантов света молекулы переходят в нестабильное возбужденное состояние, что делает их более реакционноспособными. В результате могут образовываться как вполне устойчивые соединения, так и свободные радикалы и АФК. Таким образом, ультрафиолетовое излучение, например, при солнечном перегреве, может вызывать прямое повреждение биополимеров (белков, нуклеиновых кислот), а также оказывать опосредованное свободными радикалами повреждающее действие (прямое и косвенное). Фосфолипиды, имеющие в своем составе ненасыщенные жирные кислоты, первыми испытывают на себе негативное воздействие УФ-излучения. Белки и нуклеиновые кислоты имеют максимум поглощения в ультрафиолетовой области спектра. Поглощение белков в области 200–230 и 270–300 нм обусловлено ароматическими аминокислотами, а в области 240–250 нм – сульфгидрильными (-SH-) и дисульфидными (-SS-) группами цистеина и цистина. Фотохимические процессы сопровождаются образованием свободных радикалов, которые приводят к каскаду реакций, заканчивающихся в экстремальных условиях гидропероксидацией липидов, нарушением природной структуры белка и инактивацией ферментов.

В результате нарушения физико-химических свойств липидного матрикса и белковой составляющей мембран происходит повреждение клетки в целом [14]. В связи с этим для наших исследований в качестве неблагоприятного фактора, вызывающего ПОЛ, выбрано УФ-облучение ($\lambda = 180$ –400 нм) фосфолипида в мицеллярной фазе, сформированной ДОХ.

На стадии первичных продуктов ПОЛ (гидроперекиси и др.) поврежденные под действием АФК жирные кислоты избирательно удаляются ФЛА₂. Поэтому о степени окисления фосфолипидов можно судить по активации данного фермента, что может быть зафиксировано с использованием разработанного нами гемопротеидного метода, в основу которого положены реакции, представленные на нижеприведенной схеме:



Спектральные изменения Hb, возникающие под действием отщепившейся при фосфолиполизе жирной кислоты, прямо пропорциональны ее концентрации, что позволяет определять активность ФЛА₂ (PLA₂, схема). За изменением активности фермента следят в кинетическом режиме, регистрируя спектральные изменения Hb в области полосы Соре под действием продуктов фосфолиполиза. При этом в процессе фосфолипазной реакции происходит возрастание амплитуды между максимумом (λ_{423}) и минимумом (λ_{405}) в разностных спектрах поглощения Hb (ΔD).

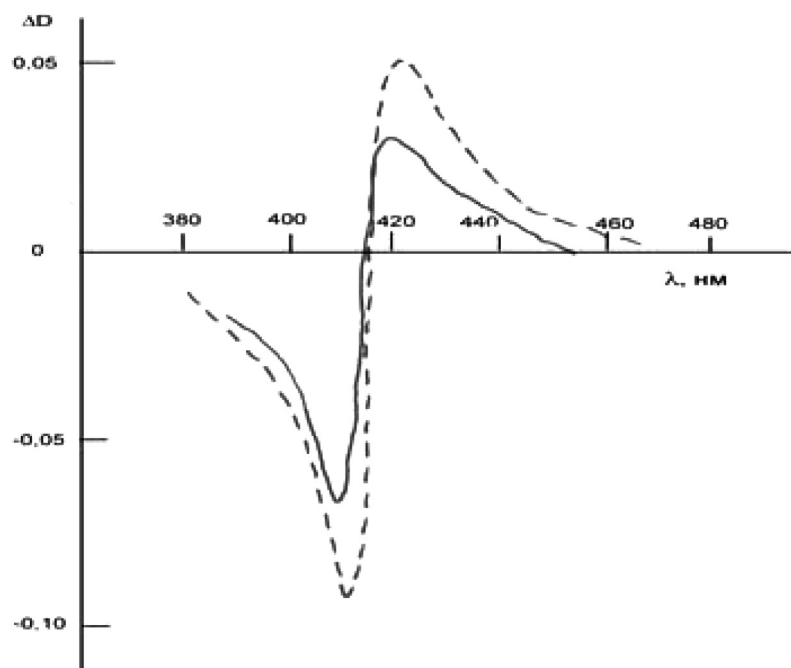


Рис. 1. Разностные спектры поглощения Hb при фосфолипидном действии ФЛА₂ УФ-облученного ФХ в мицеллярной фазе, сформированной ДОХ, (пунктир) и необлученного ФХ (сплошная линия). Условия реакции: [ФХ] = 0,6 мМ, [Hb] = 5 мкМ, [Ca²⁺] = 1 мМ, 0,8 мкг ФЛА₂; время облучения 30 мин

Fig. 1. Difference Hb absorption spectra at phospholipolys acted upon by PLA₂ due to UV-irradiated phosphatidylcholine in the micellar phase formed by sodium desoxycholate (dotted line) and non-irradiated by phosphatidylcholine (solid line). Reaction conditions: [phosphatidylcholine] = 0.6 mM, [Hb] = 5 μM, [Ca²⁺] = 1 mM, 0.8 μg PLA₂; irradiation time is 30 min

На рис. 1 представлены разностные спектры поглощения Hb, регистрируемые в начальный период времени (до 3 мин) фосфолипазной реакции при добавлении к реакционной смеси УФ-облученного ФХ в мицеллярной фазе, сформированной ДОХ (пунктир), и необлученного субстрата (сплошная линия), что показывает увеличение активности ФЛА₂ по отношению к субстрату, подвергнутому УФ-облучению.

При регистрации во времени разностных спектров поглощения Hb через 0,5 мин строятся кинетические кривые. Тангенс угла наклона этой кривой к оси абсцисс отражает прирост продукта в единицу времени: $\Delta P/\Delta t$ и характеризует начальную скорость фосфолипазной реакции. Повышение во времени скорости реакции приводит к увеличению тангенса угла наклона кинетических кривых.

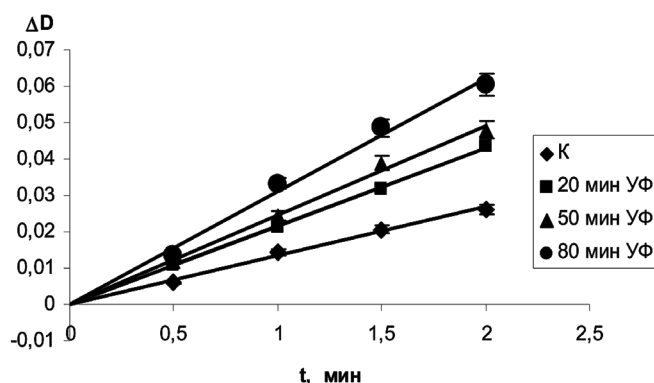


Рис. 2. Кинетические кривые изменения активности ФЛА₂ (ΔD) от времени УФ-облучения субстрата в мицеллярной фазе, сформированной ДОХ. Условия реакции: [ФХ] = 0,6 мМ, [Hb] = 5 мкМ, [Ca²⁺] = 1 мМ, 0,6 мкг ФЛА₂, 0,05М Трис-НСl-буферный раствор, pH 8,0, t комнатная

Fig. 2. Kinetic curves for the PLA₂ (ΔD) activity vs. UV-irradiation of substrate in the micellar phase formed by sodium desoxycholate degenerate. Reaction conditions: [phosphatidylcholine] = 0.6 mM, [Hb] = 5 μM, [Ca²⁺] = 1 mM, 0.6 μg PLA₂, 0.05M Tris-HCl – buffer, pH – 8.0, t – room temperature

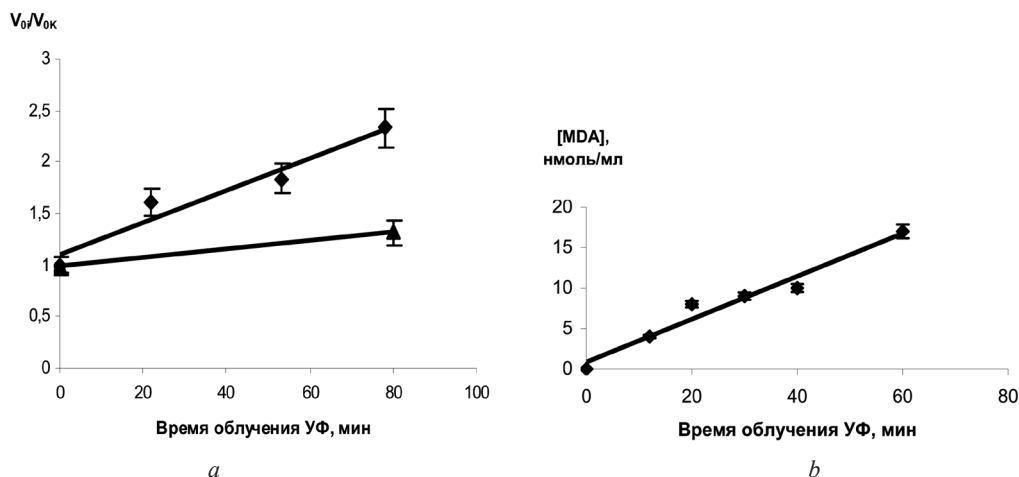


Рис. 3. Зависимость относительной скорости фосфолипазной реакции (a) и накопления малонового альдегида (b) от продолжительности УФ-облучения субстрата в мицеллярной фазе. Условия реакции: [ФХ] = 0,6 мМ, [Hb] = 5 мкМ, $[Ca^{2+}]$ = 1 мМ, 0,6 мкг ФЛА₂, 0,05М Трис-НСl-буферный раствор, pH 8,0, t комнатная

Fig. 3. Dependence of the relative velocity of phospholipase reaction (a) and malonaldehyde accumulation (b) on the UV-irradiation time of substrate in the micellar phase. Reaction conditions: [phosphatidylcholine] = 0.6 mM, [Hb] = 5 μ M, $[Ca^{2+}]$ = 1 mM, 0.6 μ g PLA₂, 0.05M Tris-HCl – buffer, pH – 8.0, t – room temperature

тической кривой (рис. 2), что обеспечивает измерение активности фермента в условных единицах – ΔD .

На рис. 3, a представлена зависимость прироста скорости фосфолипазной реакции, выраженной как V_{0i}/V_{0k} , где V_{0i} – tg угла наклона кинетической кривой на УФ-облученных мицеллах, а V_{0k} – на необлученных. Нижняя кривая показывает изменения в том же препарате мицелл, находившихся такой же срок на воздухе в условиях без УФ-облучения. Видно, что прирост активности ФЛА₂ обусловлен пребыванием мицелл ФХ-ДОХ в условиях неблагоприятного УФ-облучения.

Прямо пропорциональная зависимость активности ФЛА₂ от времени УФ-облучения субстрата сохранится в интервале до 80 мин (рис. 3, a). При этом данная зависимость позволяет определить изменения в скорости реакции уже на первых минутах облучения по величине ее прироста (V_{0i}/V_{0k}), равной в начальный период реакции не менее 1,05, что показывает нижний предел ее чувствительности.

Близкое значение относительной скорости реакции ($V_{уф}/V_{к} = 1,5$) получено для облученных мицелл ФХ методом разделения продуктов фосфолипазной реакции с помощью ТСХ с последующим определением фосфолипида реактивом Васьяковского [15] (рис. 4). То, что наблюдаемые изменения в разностных спектрах поглощения Hb и соответственно активности фермента в зависимости от продолжительности УФ-облучения коррелируют с накоплением во время облучения продуктов перекисного окисления фосфолипида, подтверждено традиционным определением в среде МДА по реакции с 2'-тиобарбитуровой кислотой (рис. 3, b). Можно видеть возрастание этого показателя ПОЛ на протяжении 60 мин облучения.

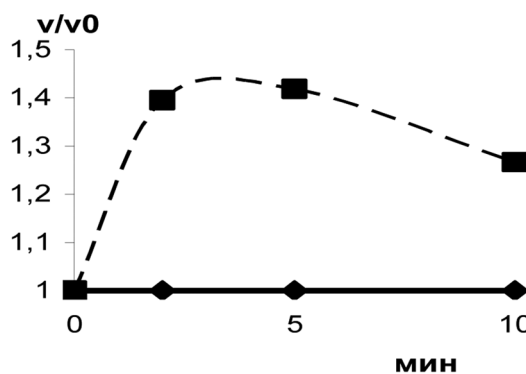


Рис. 4. Зависимость относительной скорости реакции гидролиза ФХ под действием ФЛА₂, измеренной с помощью определения продуктов ТСХ, от времени УФ-облучения субстрата. Условия реакции: [ФХ] = 0,5 мМ, $[Ca^{2+}]$ = 1 мМ, 0,05М Трис-НСl-буферный раствор, pH 8,0, соотношение ФХ : ДОХ = 1 : 2 (моль/моль), [ФЛА₂] = 5 мкг/мл реакционной смеси, t = 37 °С

Fig. 4. Dependence of the relative velocity of the hydrolysis reaction of phosphatidylcholine acted upon by PLA₂ measured from the determination of TCL products on the substrate UV-irradiation time. Reaction conditions: [phosphatidylcholine] = 0.5 mM, $[Ca^{2+}]$ = 1 mM, 0.05M Tris-HCl – buffer, pH – 8.0, the phosphatidylcholine-to-sodium desoxycholate ratio is 1 : 2 (mole/mole), [PLA₂] = 5 μ g/ml of reaction mixture, t = 37 °C

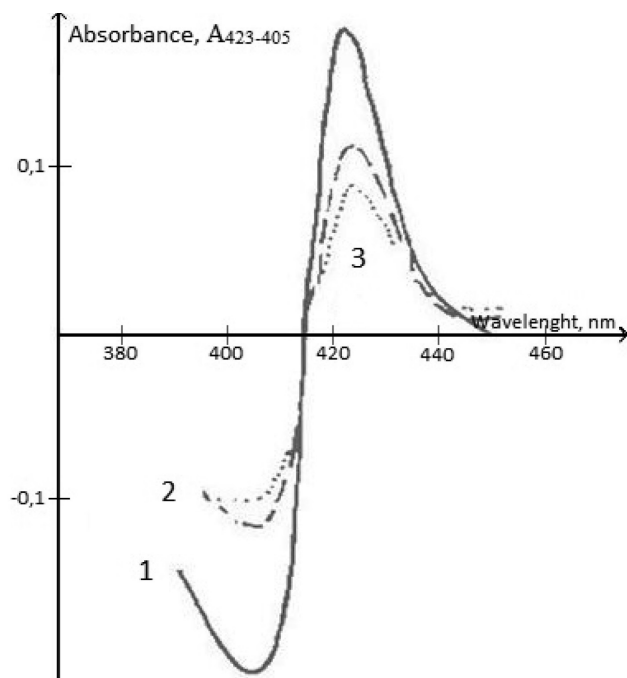


Рис. 5. Разностные спектры поглощения Hb при фосфолипидизации субстрата под действием ФЛА₂ через 3 мин после начала реакции: 1 – облученные мицеллы ФХ–ДОХ в отсутствие сыворотки крови (сплошная линия); 2 – необлученные мицеллы ФХ–ДОХ без сыворотки крови (крупный пунктир); 3 – облученные мицеллы ФХ–ДОХ с сывороткой (мелкий пунктир). Условия реакции: [ФХ] = 0,05 мМ, [Hb] = 5 мкМ, [Ca²⁺] = 1 мМ, [ФЛА₂] = 0,6 мкг, $t = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$

Fig. 5. Difference Hb absorption spectra at substrate phospholipolys acted upon by PLA₂ in 3 min after the reaction start: 1 – irradiated phosphatidylcholine–sodium desoxycholate micelles in the absence of blood serum (solid line); 2 – non-irradiated phosphatidylcholine–sodium desoxycholate micelles in the absence of blood serum (large dotted line); 3 – irradiated phosphatidylcholine–sodium desoxycholate micelles in the presence of blood serum (small dotted line). Reaction conditions: [phosphatidylcholine–sodium] = 0.05 mM, [Hb] = 5 μM, [Ca²⁺] = 1 mM, [PLA₂] = 0.6 μg, $t = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$

наибольшее увеличение интенсивности между максимумом и минимумом в разностном спектре гемоглобина (ΔD) при фосфолипидизации УФ-облученного ФХ (рис. 5, спектр 1), что отражает усиление активности ФЛА₂ по отношению к субстрату. Амплитуда разностного спектра существенно снижается в зависимости от дозы сыворотки крови за счет ее антиоксидантного потенциала (рис. 5, спектр 3).

На рис. 6 представлена калибровочная кривая с использованием стандартного антиоксиданта Тролокса, построенная на основе изменения активности ФЛА₂ в зависимости от УФ-облучения. Для построения калибровочной кривой субстрат облучали УФ в присутствии разных концентраций Тролокса в течение 20 мин, затем инициировали фосфолипазную реакцию его добавлением (по 100 мкл) к одной из уравновешенных кювет. Одновременно в контрольную кювету добавляли такое же количество УФ-облученного дезоксихолата натрия. По калибровочной кривой можно определить ОАА биологической жидкости (рис. 6).

Антиоксидантная активность выражается в условных единицах: $\text{ОАА} = 1 - \text{tg}(\text{УФ} + \text{Тр}) / \text{tgУФ}$, где ОАА – общая антиоксидантная активность; tgУФ – угол наклона кинетической кривой (начальной скорости) фосфолипазной реакции на облученных мицеллах ФХ–ДОХ; $\text{tg}(\text{УФ} + \text{Тр})$ – угол наклона кинетической кривой на облученных УФ мицеллах в присутствии соответствующей концентрации Тролокса.

Сравнение результатов, представленных на рис. 3 и 4, показывает, что изменение активности ФЛА₂ при УФ-облучении субстрата в мицеллярной фазе, сформированной ДОХ, адекватно отражает процессы ПОЛ и может служить его индикатором.

В предварительных экспериментах установлено, что в процессе фосфолипидизации с участием ФЛА₂ в пробах, содержащих подвергнутый УФ-облучению фосфолипид и сыворотку крови (опытная проба), и в присутствии необлученной сыворотки крови и мицелл ДОХ (контрольная проба) под действием продукта реакции фосфолипидизации – жирной кислоты – превращение гемоглобина в гемихром происходит дозозависимо, что регистрируется по изменению в разной степени амплитуды дифференциального спектра в видимой области [16].

Действительно, продолжение исследований показало, что в каждой из проб различия в содержании двух форм гемоглобина сопровождаются пропорциональным изменением разностного спектра, который позволяет по спектральному сдвигу в области полосы Соре гемоглобина провести в присутствии биологической жидкости измерение активности ФЛА₂ как индикатора изменений в процессе перекисного окисления фосфолипидов (рис. 5).

Сравнение амплитуды разностных спектров гемоглобина, полученных при наличии в исследуемой реакционной смеси необлученного и облученного субстрата, а также облученного ФХ с сывороткой показывает

Заклучение. Результаты экспериментальных исследований показали реальную возможность использования определения активности ФЛА₂ для характеристики общей антиоксидантной активности и оценки способности к противодействию факторам инициации окислительного стресса при неблагоприятном внешнем воздействии. Уровень активности ФЛА₂ может служить индикатором для выявления степени окисления фосфолипидной фракции мембраны и определения безопасных для нее доз ультрафиолетового облучения.

На основе использования антиоксиданта Тролокса в качестве стандарта при индуцированном перекисном окислении мицелл природного фосфолипида определен в процессе фосфолиполиза с участием ФЛА₂ диапазон концентраций Тролокса, в пределах которого наблюдается линейная зависимость антиоксидантной активности, выраженной в относительных единицах, что свидетельствует о перспективности использования этого стандарта для оценки первичного ПОЛ непосредственно в липидной фазе и антиоксидантного потенциала биологических жидкостей, например, крови¹ [17].

Таким образом, при исследовании отдельных звеньев процесса свободно-радикального окисления и компонентов антиоксидантной системы *in vitro* целесообразно использовать разработанную нами новую модельную систему из 3 составных частей (модулей): системы генерации АФК; продуктов свободно-радикального окисления и системы их индикации, т. е. проводить изучение эффективности свободно-радикального окисления в модельных фосфолипидных мембранах (смешанных мицеллах фосфатидилхолина и дезоксихолата натрия) в условиях внешнего воздействия неблагоприятных факторов в виде УФ-облучения и определения степени перекисного окисления липидов по активности фосфолипазы А₂ как его специфического маркера непосредственно в липидной фазе.

Использование такой модельной системы позволит более тщательно изучить отдельные стадии свободно-радикального окисления и взаимодействие тех или иных компонентов клетки с различными активными формами кислорода и продуктами свободно-радикального окисления.

Список использованных источников

1. Davies, K. J. Oxidative stress: the paradox of aerobic life / K. J. Davies // Biochem. Soc. Symp. – 1995. – Vol. 61. – P. 1–31. doi.org/10.1042/bss0610001
2. Halliwell, B. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts / B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge // Arch. Biochem. Biophys. – 1986. – Vol. 246, N 2. – P. 501–506. doi.org/10.1016/0003-9861(86)90305-x
3. Berliner, J. A. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis / J. A. Berliner, J. W. Heinecke // Free Radic. Biol. Med. – 1996. – Vol. 20, N 5. – P. 707–727. doi.org/10.1016/0891-5849(95)02173-6
4. Benzie, I. F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences / I. F. Benzie // Int. J. Food Sci. Nutr. – 1996. – Vol. 47, N 3. – P. 233–261. doi.org/10.3109/09637489609012586
5. Probulco improves antioxidant activity and modulates development of diabetic cardiomyopathy / N. Kaul [et al.] // Nutrition. – 1995. – Vol. 11, N 5. – P. 551–554.
6. Ha, H. Role of oxidative stress in the development of diabetic nephropathy / H. Ha, K. H. Kim // Kidney Int. – 1995. – Vol. 51. – P. 18–21.
7. Does oxidant stress play a role in diabetic retinopathy / M. Rema [et al.] // Indian J. Ophthalmol. – 1995. – Vol. 43, N 1. – P. 17–21.
8. Bergeron, C. J. Oxidative stress: its role in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis / C. J. Bergeron // Neurol. Sci. – 1995. – Vol. 129. – P. 81–84. doi.org/10.1016/0022-510x(95)00071-9

¹ Композиция и способ определения общей антиоксидантной активности сыворотки крови: пат. Респ. Беларусь №019669 / Н. М. Литвинко, Л. А. Скоростецкая, Д. О. Герловский; заяв. Ин-т биоорганической химии НАН Беларуси, заявл. 13.01.11, заявка а20110048.

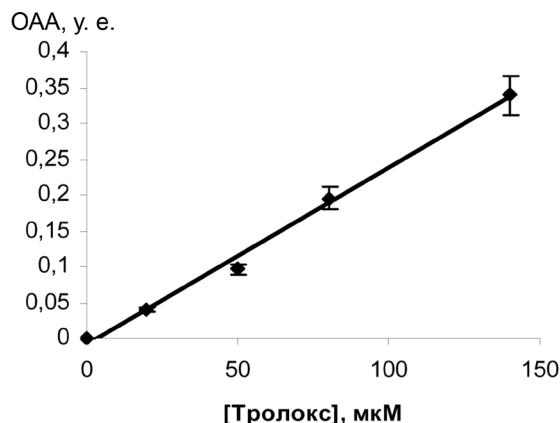


Рис. 6. Калибровочная кривая для оценки ОАА с использованием стандартного антиоксиданта Тролокса в условиях фосфолиполиза с участием ФЛА₂. Условия: мицеллы ФХ–ДОХ ([ФХ] = 0,6 мМ, ФХ/ДОХ = 1/3, моль/моль) в 0,05М Трис–НСl-буферном растворе, рН 8,0 (1 мл), содержащем [Hb] = 5 мкМ, [Ca²⁺] = 1 мМ, 0,3 мкг ФЛА₂, *t* = 18–20 °С

Fig. 6. Calibrated curves for estimation of the antioxidant activity with the use of a standard antioxidant Trolox under the phospholipolys conditions involving PLA₂. Conditions: micelles of phosphatidylcholine and sodium desoxycholate ([phosphatidylcholine] = 0.6 mM, phosphatidylcholine/sodium desoxycholate = 1/3, mole/mole) in 0.05 M Tris-HCl – buffer, pH – 8.0 (1 ml) containing [Hb] = 5 μM [Ca²⁺] = 1 mM, 0.3 μg PLA₂, *t* = 18–20 °C

9. Obara, Y. The oxidative stress in the cataract formation / Y. Obara // *Nippon Ganka Gakkai Zashi*. – 1995. – Vol. 99, N 12. – P. 1303–1341.
10. McLean, L. R. Role of lipid structure in the activation of phospholipase A₂ by peroxidized phospholipids / L. R. McLean, K. A. Hagaman, W. S. Davidson // *Lipids*. – 1993. – Vol. 28, N 6. – P. 505–509. doi.org/10.1007/bf02536081
11. Препаративная биохимия липидов / Л. Д. Бергельсон [и др.]. – М.: Наука, 1981. – С. 256.
12. Действие фосфолипаз на химерные субстраты, созданные на основе фосфолипидов и нуклеиновых кислот / Н. М. Литвинко [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2005. – Т. 49, № 4. – С. 70–73.
13. Data for Biochemical Research / R. M. C. Dawson [et al.]. – 2nd ed. – New York: Oxford University Press, 1986. – P. 138.
14. Владимиров, Ю. А. Свободные радикалы в первичных фотобиологических процессах / Ю. А. Владимиров // Биол. мембраны. – 1998. – Т. 15, № 5. – С. 517–530.
15. Vaskovsky, V. E. A universal reagent for phospholipid analysis / V. E. Vaskovsky, E. Y. Kostetsky, J. M. Vasendin // *J. Chromat.* – 1975. – Vol. 114, N 1. – P. 129–141. doi.org/10.1016/s0021-9673(00)85249-8
16. Литвинко, Н. М. Определение антиоксидантной способности сыворотки крови с использованием липидной фазы / Н. М. Литвинко, Л. А. Скоростецкая, Д. О. Герловский // XIX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии: тез. докл.: в 4 т. – Волгоград: ИУНЛ ВолгГТУ, 2011. – Т. 1: Пленарные доклады. Фундаментальные проблемы химической науки. – С. 376.

References

1. Davies K. J. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposium*, 1995, vol. 61, pp. 1–31. doi.org/10.1042/bss0610001
2. Halliwell B., Gutteridge J. M. C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1986, vol. 246, no. 2, pp. 501–506. doi.org/10.1016/0003-9861(86)90305-x
3. Berliner J. A., Heinecke J. W. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 1996, vol. 20, no. 5, pp. 707–727. doi.org/10.1016/0891-5849(95)02173-6
4. Benzie I. F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 1996, vol. 47, no. 3, pp. 233–261. doi.org/10.3109/09637489609012586
5. Kaul N., Siveliski-Iliskovic N., Thomas T. P., Hill M., Khaper N., Singal P. K. Probucol improves antioxidant activity and modulates development of diabetic cardiomyopathy. *Nutrition*, 1995, vol. 11, no. 5, pp. 551–554.
6. Ha H., Kim K. H. Role of oxidative stress in the development of diabetic nephropathy. *Kidney International*, 1995, vol. 51, pp. 18–21.
7. Rema M., Mohan V., Bhaskar A., Shanmugasundaram K. R. Does oxidant stress play a role in diabetic retinopathy. *Indian Journal of Ophthalmology*, 1995, vol. 43, no. 1, pp. 17–21.
8. Bergeron C. J. Oxidative stress: its role in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 1995, vol. 129, pp. 81–84. doi.org/10.1016/0022-510x(95)00071-9
9. Obara Y. The oxidative stress in the cataract formation. *Nippon Ganka Gakkai Zashi*, 1995, vol. 99, no. 12, pp. 1303–1341.
10. McLean L. R., Hagaman K. A., Davidson W. S. Role of lipid structure in the activation of phospholipase A₂ by peroxidized phospholipids. *Lipids*, 1993, vol. 28, no. 6, pp. 505–509. doi.org/10.1007/bf02536081
11. Bergelson L. D., Dyatlovitskaya E. V., Molotkovskii Yu. G., Batrakov S. G. *Preparative biochemistry of lipid*. Moscow, Nauka Publ., 1981. 256 p. (in Russian).
12. Litvinko N. M., Kuchuro S. V., Rakhuba G. N., Skorostetskaya L. A., Kalinichenko E. N., Zhernosek E. V. Action of phospholipases on chimera substrates, prepared on the base of phospholipids and nucleic acids. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2005, vol. 49, no. 4, pp. 70–73 (in Russian).
13. Dawson R. M. C. *Data for Biochemical Research*, 2nd ed., New York, Oxford University Press, 1986. 138 p.
14. Vladimirov Yu. A. Free radicals in primary photobiological processes. *Biochemistry (Moscow) Supplement. Series A: Membrane and Cell Biology*, 1998, vol. 12, no. 5, pp. 645–663.
15. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y., Vasendin J. M. A universal reagent for phospholipid analysis. *Journal of Chromatography A*, 1975, vol. 114, no. 1, pp. 129–141. doi.org/10.1016/s0021-9673(00)85249-8
16. Litvinko N. M., Skorostetskaya L. A., Gerlovsky D. O. Determination of the antioxidant capacity of blood serum using the lipid phase. *XIX Mendeleevskii s'ezd po obshchei i prikladnoi khimii: tezisy dokladov. T. 1: Plenarnye doklady. Fundamental'nye problemy khimicheskoi nauki* [XIX Mendeleev Congress on General and Applied Chemistry: abstracts. Volume 1: Plenary reports. Fundamental problems of chemical science]. Volgograd, Publishing house of educational and scientific literature of Volgograd State Technical University, 2011, pp. 376 (in Russian).

Информация об авторах

Литвинко Наталья Михайловна – д-р хим. наук, доцент, заведующая лабораторией. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: al_h@mail.ru.

Скоростецкая Лидия Адамовна – науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: lydiask@gmail.com

Герловский Денис Олегович – канд. хим. наук, науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: denis2904-83@mail.ru.

Information about the authors

Litvinko Natalia Mikhailovna – D. Sc. (Chemistry), Assistant Professor, Head of the Laboratory. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: al_h@mail.ru.

Skorostetskaya Lydia Adamovna – Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lydiask@gmail.com

Gerlovsky Denis Olegovich – Ph. D. (Chemistry), Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: